

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004773

International filing date: 17 March 2005 (17.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-217552
Filing date: 26 July 2004 (26.07.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

06.4.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 7 月 2 6 日
Date of Application:

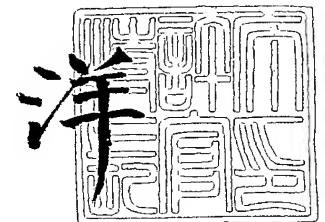
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 2 1 7 5 5 2
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 2 1 7 5 5 2]

出 願 人 大 野 弘 幸
Applicant(s): 日 清 紡 績 株 式 会 社

2 0 0 5 年 3 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 8 1 8 8

【書類名】 特許願
【整理番号】 16275
【提出日】 平成16年 7月26日
【あて先】 特許庁長官 小川 洋 殿
【国際特許分類】 A01N 1/00
B01F 3/12
C07C211/62

【発明者】
【住所又は居所】 東京都江戸川区一之江町 3 0 0 2 番地 ライオンズガーデン一之江 3 1 4
【氏名】 大野 弘幸

【発明者】
【住所又は居所】 東京都小平市鈴木町 1 - 2 4 5 - 6
【氏名】 深谷 幸信

【特許出願人】
【識別番号】 502322947
【氏名又は名称】 大野 弘幸

【特許出願人】
【識別番号】 000004374
【氏名又は名称】 日清紡績株式会社

【代理人】
【識別番号】 100079304
【弁理士】
【氏名又は名称】 小島 隆司

【選任した代理人】
【識別番号】 100114513
【弁理士】
【氏名又は名称】 重松 沙織

【選任した代理人】
【識別番号】 100120721
【弁理士】
【氏名又は名称】 小林 克成
【電話番号】 03-3545-6454
【連絡先】 担当

【選任した代理人】
【識別番号】 100124590
【弁理士】
【氏名又は名称】 石川 武史

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004- 84702
【出願日】 平成16年 3月23日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 003207
【納付金額】 16,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0313530

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

核酸を溶解することのできるイオン性液体からなることを特徴とする核酸溶解用溶媒。

【請求項 2】

前記イオン性液体を構成するカチオンが、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオンおよびピリジニウムカチオンから選ばれる少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 1 記載の核酸溶解用溶媒。

【請求項 3】

前記イオン性液体を構成するアニオンが、ハロゲン化物イオンまたは総炭素数 1～3 のカルボン酸イオンであることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の核酸溶解用溶媒。

【請求項 4】

核酸保存用または核酸反应用であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の核酸溶解用溶媒。

【請求項 5】

核酸をイオン性液体に溶解させてなることを特徴とする核酸含有溶液。

【請求項 6】

核酸をイオン性液体中に溶解させた状態で保存することを特徴とする核酸保存方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸溶解用溶媒、核酸含有溶液および核酸保存方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸溶解用溶媒、核酸含有溶液および核酸保存方法に関し、さらに詳述すると、イオン性液体からなるDNA、RNA等の核酸溶解用溶媒、およびこの溶媒を用いた核酸含有溶液、核酸保存方法に関する。

【背景技術】

【0002】

DNAおよびRNAは、遺伝を司る遺伝情報物質である。そのゲノム情報を解読し、遺伝子配列を組み換える等のバイオテクノロジー技術を用い、遺伝子レベルでの生物種の機能改善が多方面で試みられている。

また、これらDNAおよびRNAの用途は、上記バイオテクノロジー分野に留まらず、DNAやRNAの遺伝情報を活用した遺伝子診断、遺伝子治療、疾病原因の解明等の医療分野における新規診断・治療法としての応用も急速に進展している。

【0003】

一方で、核酸は、生物であれば必ず持っている生体高分子であり、天然に大量に存在することや、生分解性があることなど、材料として特筆すべき点が多い。しかも、DNAやRNAは、化学的な手法により、さらなる高機能化が可能な材料でもある。このため、DNAおよびRNAを工業的な材料として利用するための研究が進展している。

【0004】

ところで、DNAは、プリンまたはピリミジンの誘導体である含窒素複素環式塩基、すなわち、核酸塩基を1分子、デオキシリボースを1分子、リン酸を1分子含むデオキシリボヌクレオチドモノマー単位からなる鎖状の高分子である。一方、RNAも、核酸塩基を1分子、リボースを1分子、リン酸を1分子含むリボヌクレオチドモノマー単位の共有結合鎖からなる。

このように、DNAおよびRNAは、親水性のリン酸および糖を主骨格として有する高分子化合物であるため、極めて親水性が高い物質である。

【0005】

DNAおよびRNAの取り扱い、これらが極めて高い親水性を有することから、従来、水を溶媒とする系でのみ取り扱われていた。

水は、核酸を溶解するのに好適な溶媒ではあるものの、使用可能な温度範囲は0～10℃程度と狭く、また水中では取り扱うことができない試薬などを用いた反応を起こすことができないなど、核酸を工業的に応用する際の条件が限られてしまうという問題があった。このため、使用可能な温度範囲が広く、水中では進行し難い、または水中では不可能な反応を行うことのできる溶媒が求められている。

【0006】

また、DNA、RNAは、それぞれDNA分解酵素、RNA分解酵素により水中では容易に加水分解を受けることが知られており、DNAおよびRNAの保存に際しては、DNA分解酵素やRNA分解酵素を除去した水中に溶存させる必要がある。

しかし、水は蒸発し易い溶媒であるため、保存容器に工夫が必要となる。しかも、生体から直接抽出した核酸試料中にDNA、RNAの分解酵素が含まれている場合や、生物の唾液中に存在している、または皮膚に付着している核酸分解酵素が外部から系内に混入した場合は、系内に存在または混入した酵素の活性によりDNAまたはRNAが容易に分解されることから、水を溶媒として長期的にDNA、RNAを保存することは不可能であった。

【0007】

DNAおよびRNA分解酵素を失活させる試薬を利用してDNAおよびRNAの長期保存を可能とする方法も知られているが、使用する試薬によっては、細胞毒性や癌原性を有するものもあり、さらには、核酸塩基を化学修飾する可能性もあるため、簡便な保存法と

まではなっていない。

一方、核酸を含む試料を凍結乾燥することにより、水の非存在下において、核酸を保存することも可能であるが、この方法は、凍結乾燥機のある場所でなければ実施することができず、また乾燥後、0℃以下で保存しなければならないことから、簡便な保存法とはなり得ない。

【0008】

DNAおよびRNA分解酵素は、高濃度の無機塩を含む水溶液中では高次構造が壊れ、変性することが報告されている（非特許文献1：P.J. von Hippel, J. Biol. Chem., 10, 3913(1965)）。

この技術を応用し、DNAおよびRNAを高塩濃度の水溶液に溶解させることが簡便な長期保存法となり得ると考えられる。

しかし、溶媒として水を使用することによりはなれないため、その蒸発を防止する工夫が必要であるのみならず、保存後に、DNAおよびRNAを脱塩するための複雑な操作が必要となることから、長期保存法として適当なものであるとはいえない。

このように、DNAおよびRNAを簡便に長期間保存し得る手法の確立が求められている。

【0009】

【非特許文献1】P.J. von Hippel, J. Biol. Chem., 10, 3913 (1965)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、このような事情に鑑みてなされたものであり、DNAおよびRNA等の核酸を容易に溶解できるとともに、それらの長期保存が可能な核酸溶解用溶媒、およびこの溶媒を用いた核酸含有溶液、核酸保存方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討を重ねた結果、室温で液状の塩、すなわちイオン性液体が、DNA、RNAを容易に溶解し得ることを見出すとともに、DNA、RNAをイオン性液体中に溶解させた状態で長期保存が可能となることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

1. 核酸を溶解することのできるイオン性液体からなることを特徴とする核酸溶解用溶媒、
2. 前記イオン性液体を構成するカチオンが、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオンおよびピリジニウムカチオンから選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする1の核酸溶解用溶媒、
3. 前記イオン性液体を構成するアニオンが、ハロゲン化物イオンまたは総炭素数1～3のカルボン酸イオンであることを特徴とする1または2の核酸溶解用溶媒、
4. 核酸保存用または核酸反応用であることを特徴とする1～3のいずれかの核酸溶解用溶媒、
5. 核酸をイオン性液体に溶解させてなることを特徴とする核酸含有溶液、
6. 核酸をイオン性液体中に溶解させた状態で保存することを特徴とする核酸保存方法を提供する。

【発明の効果】

【0012】

本発明の核酸溶解用溶媒は、核酸可溶のイオン性液体からなるものであるため、DNA、RNAを容易に溶解し得るだけでなく、DNA、RNAをイオン性液体中に溶解させた状態で長期間保存することができる。

すなわち、イオン性液体は、高イオン密度であり、また水と同様に極性が高い液体であるため、多数の親水性基を有するDNA、RNA等を溶解することができる。

また、イオン性液体は、極めて高いイオン強度を有しており、この液体中では核酸分解酵素が失活するためか、DNA、RNAをイオン性液体中に溶解させることで、長期間安定的な保存が可能となる。しかも、イオン性液体は、蒸気圧が極めて低いか、全く無いため、高温・減圧下でも蒸発しない。このため、保存に際して容器等に工夫をこらさなくとも、長期に亘りイオン性液体の基本性能を維持することができ、この点からしても長期保存に最適である。

さらに、イオン性液体は、広い温度域で液状を示す物質であるため、核酸の反応溶媒としてイオン性液体を使用した場合、従来の水と異なり、広い温度域での反応が可能となるだけでなく、水中で取り扱いが不可能な試薬を用いた反応を行うことも可能となるものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明についてさらに詳しく説明する。

本発明に係る核酸溶解用溶媒は、イオン性液体からなるものである。

イオン性液体としては、核酸を溶解することのできる（核酸可溶な）ものであれば、特に限定されるものではないが、核酸の溶解性に優れているという点から、それを構成するカチオンが、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオンおよびピリジニウムカチオンから選ばれる少なくとも1種であるものであることが好ましい。中でも核酸の溶解性に著しく優れ、高濃度の核酸含有溶液を調製できることから、特にイミダゾリウムカチオンであることが好ましい。

なお、本発明において、「核酸を溶解することのできる（核酸可溶な）」とは、溶媒中に核酸を10質量%以下、好ましくは5.0質量%以下程度の量で添加してなる白濁液を、加熱する等により核酸を溶解させて均一透明溶液とした後、室温（20℃程度）まで冷却しても析出してこない性状をいう。

【0014】

イミダゾリウムカチオンとしては、特に限定はなく、例えば、ジアルキルイミダゾリウムカチオン、トリアルキルイミダゾリウムカチオン等が挙げられ、具体例としては、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムイオン、1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムイオン、1-プロピル-3-メチルイミダゾリウムイオン、1-（1,2または3-ヒドロキシプロピル）-3-メチルイミダゾリウムイオン、1,2,3-トリメチルイミダゾリウムイオン、1,2-ジメチル-3-エチルイミダゾリウムイオン、1,2-ジメチル-3-プロピルイミダゾリウムイオン、1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウムイオンなどが挙げられる。

ピリジニウムカチオンとしては、特に限定されるものではなく、例えば、N-プロピルピリジニウムイオン、N-ブチルピリジニウムイオン、1-ブチル-4-メチルピリジニウムイオン、1-ブチル-2,4-ジメチルピリジニウムイオンなどが挙げられる。

【0015】

アンモニウムカチオンとしては、特に限定されるものではないが、脂肪族または脂環式4級アンモニウムイオンをカチオン成分とするものであることが好ましい。

これらの脂肪族および脂環式4級アンモニウムイオンとしても、特に限定されるものではなく、例えば、トリメチルプロピルアンモニウムイオン、トリメチルヘキシルアンモニウムイオン、テトラペンチルアンモニウムイオン、ジエチルメチル（2-メトキシエチル）アンモニウムイオン等の種々の4級アルキルアンモニウムイオン、N-ブチル-N-メチルピロリジニウムイオンなどが挙げられる。

【0016】

また、イオン性液体を構成するアニオンとしては、例えば、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 AsF_6^- 、 SbF_6^- 、 AlCl_4^- 、 HSO_4^- 、 ClO_4^- 、 CH_3SO_3^- 、 CF_3SO_3^- 、 CF_3CO_2^- 、 $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{CO}_2^-$ 、 CH_3CO_2^- 、 HCO_2^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 等の各種アニオンを用いることができるが、核酸の溶解性を高めるという点からハロゲン化物イオンまたは総炭素数1～3のカルボン酸イオンが好ましく、中でも Cl^- 、 Br^- 、 H

CO_2^- であることが好ましい。

【0017】

イオン性液体は、加熱真空脱水されたものであることが好ましく、その含水量としては、1.0質量%以下、好ましくは0.5質量%以下程度であることが好ましい。なお、加熱温度、減圧度等はイオン性液体の種類に応じて適宜選定すればよい。また、含水量は、カールフィッシャー水分計による測定値である。

【0018】

本発明に係る核酸含有溶液は、上述したイオン性液体からなる核酸溶解用溶媒に核酸を溶解させてなるものである。

この場合、イオン性液体中における核酸含有量としては、使用するイオン性液体の種類によって溶解度が変動するものであるため、一概には規定できないが、通常10質量%以下、好ましくは1.0～5.0質量%程度である。

【0019】

イオン性液体中に、核酸を溶解させる手法としては、特に限定されるものではないが、イオン性液体中に所定量の核酸を添加した後、70～120℃程度に加熱して核酸を溶解させる方法を用いることができる。この場合、核酸がイオン性液体中に溶解したか否かは、核酸を添加した時点では白濁状の溶液が、加熱後に均一透明になることから判断できる。

本発明の核酸溶解用溶媒を用いた核酸含有溶液は、これを一旦加熱して、核酸を溶解させて均一透明状態とした後、再び10～25℃程度に冷却しても、核酸が析出して白濁を呈することはない。

【0020】

以上で説明した核酸溶解用溶媒および核酸含有溶液は、DNA、RNA等の核酸を溶存させる必要がある全ての用途に適用可能である。

具体例としては、核酸溶解用溶媒を核酸の保存に用い、核酸含有溶液とした状態で保存することで、核酸分解酵素が失活する環境下で核酸を保存することができ、極めて簡便に核酸の長期安定保存が可能となる。この場合、保存温度としては特に限定されるものではないが、一般的な環境温度である0～40℃程度での保存が可能であり、特殊な環境下でなく室温にて長期間保存することができる。

また、核酸溶解用溶媒を核酸の反応に用い、この溶媒中でDNA、RNAの化学修飾反応等を行うことで、従来溶媒である水中では取り扱うことのできなかった試薬を用いた反応や、水中では進行し難い反応を、0～100℃の温度範囲の制限を受けることなく行うことができる。

【実施例】

【0021】

以下、合成例および実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明するが、本発明は、下記の実施例に限定されるものではない。なお、下記実施例におけるイオン性液体の構造確認は、 $^1\text{H-NMR}$ (Alpha-500、日本電子(株)製)を用いて行った。また、合成例6～8において、生成物中にハロゲン化物が混入していないことは0.1M硝酸銀水溶液(関東化学(株)製)を添加した際にハロゲン化銀の生成に伴う溶液の白濁が起こらないことにより確認した。さらに、イオン性液体中にDNAおよびRNAが溶解したことは、白濁状態から均一透明溶液になることで判断した。

【0022】

[合成例1]

N-メチルイミダゾール(アルドリッチ社製)10gと3-クロロ-1-プロパノール(東京化成工業(株)製)12gとを混合し、窒素雰囲気下、60℃で還流しながら7日間攪拌した後、反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製)300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール(和光純薬工業(株)製)10mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をエタノール(和光純薬工業(株)製)300mlに溶解し、活性炭素粉末

(和光純薬工業(株)製) 20 gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Clを得た。

【0023】

[合成例2]

N-メチルイミダゾール 5 gと3-ブロモ-1-プロパノール(アルドリッチ社製) 8.5 gとを混合し、窒素雰囲気下、60℃で還流しながら3日間攪拌した後、反応生成物をジエチルエーテル250 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール10 mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をメタノール300 mlに溶解し、活性炭素粉末20 gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Brを得た。

【0024】

[合成例3]

N-メチルイミダゾール 10 gと1-クロロプロパン(東京化成工業(株)製) 50 gとを混合し、窒素雰囲気下、45℃で還流しながら7日間攪拌した後、未反応の1-クロロプロパンを留去し、反応生成物をジエチルエーテル300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール10 mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をアセトニトリル(和光純薬工業(株)製) 300 mlに溶解し、活性炭素粉末20 gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体PMIN-Clを得た。

【0025】

[合成例4]

N-メチルイミダゾール 10 gと1-ブロモプロパン(関東化学(株)製) 50 gとを混合し、窒素雰囲気下、50℃で還流しながら4日間攪拌した後、反応生成物をジエチルエーテル300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール10 mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。得られた液体をアセトニトリル300 mlに溶解し、活性炭素粉末20 gを添加し、24時間攪拌した。その後、活性炭素粉末を濾別し、溶媒を減圧下にて留去することにより、イオン性液体PMIN-Brを得た。

【0026】

[合成例5]

N-メチルイミダゾール(アルドリッチ社製) 10 gとプロモエタン(関東化学(株)製) 20 mlとを混合し、窒素雰囲気下、0℃で2日間反応させた後、反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製) 300 ml中に滴下し、沈殿した白色固体を回収した。沈殿物にジエチルエーテル300 mlを添加して2時間攪拌した後、沈殿した白色固体を回収した。残存する溶媒を減圧下にて留去することにより、EMIm-Brを得た。

【0027】

[合成例6]

合成例5で得たEMIm-Br 2 gを脱イオン水60 mlに溶解した溶液を、陰イオン交換樹脂アンバーライト IRA-400 (OH) (Sperco社製) 150 mlを充填したカラムに通し、EMIm-OHの水溶液を得た。

【0028】

[合成例7]

合成例6で得たEMIm-OH水溶液60 mlと、プロピオン酸(関東化学(株)製) 0.8 gとを混合し、24時間氷浴中で攪拌した後、水を減圧下にて留去し、反応生成物を得た。反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製) 300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール(和光純薬工業(株)製) 5 mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300 ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。減圧下、

回収した沈殿物から残存溶媒を留去してイオン性液体EMI_m-C₂COOを得た。

【0029】

[合成例8]

合成例6で得たEMI_m-OH水溶液60mlと、ぎ酸(和光純薬工業(株)製)0.5gとを混合し、24時間氷浴中で攪拌した後、水を減圧下にて留去し、反応生成物を得た。反応生成物をジエチルエーテル(関東化学(株)製)300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。沈殿物をメタノール(和光純薬工業(株)製)5mlに溶解させた溶液を、ジエチルエーテル300ml中に滴下し、沈殿した液体を回収した。減圧下、回収した沈殿物から残存溶媒を留去してイオン性液体EMI_m-HCOOを得た。

【0030】

[実施例1]

合成例1で作製したイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Cl 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA(大和化成(株)製)10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Cl 1gに完全に溶解する温度は70℃であった。

【0031】

[実施例2]

合成例1で作製したイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Cl 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA(東京化成工業(株)製)10mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Cl 1gに完全に溶解する温度は60℃であった。

。

【0032】

[実施例3]

合成例2で作製したイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Br 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Br 1gに完全に溶解する温度は87℃であった。

【0033】

[実施例4]

合成例2で作製したイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Br 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体HO(CH₂)₃MIN-Br 1gに完全に溶解する温度は82℃であった。

【0034】

[実施例5]

合成例3で作製したイオン性液体PMIN-Cl 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA10mgがイオン性液体PMIN-Cl 1gに完全に溶解する温度は80℃であった。

【0035】

[実施例6]

合成例3で作製したイオン性液体PMIN-Cl 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA10mgがイオン性液体PMIN-Cl 1gに完全に溶解する温度は70℃であった。

【0036】

[実施例7]

合成例4で作製したイオン性液体PMIN-Br 1gを110℃で24時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA10mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶

解温度を記録した。その結果、DNA 10 mg がイオン性液体 PMIN-Br 1 g に完全に溶解する温度は 90℃であった。

【0037】

[実施例 8]

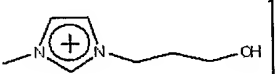
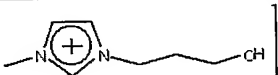
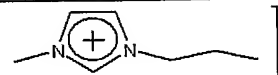
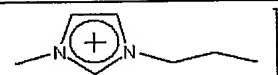
合成例 4 で作製したイオン性液体 PMIN-Br 1 g を 110℃で 24 時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下で RNA 10 mg と混合し、密封した後、加熱しながら DNA の溶解温度を記録した。その結果、RNA 10 mg がイオン性液体 PMIN-Br 1 g に完全に溶解する温度は 82℃であった。

【0038】

上記各実施例 1～8 において使用したイオン性液体の構造、DNA および RNA の各イオン性液体に対する溶解温度を表 1 に示す。

【0039】

【表 1】

	イオン性液体		核酸溶解温度 (°C)
	名称	構造式	
実施例 1	OH(CH ₂) ₃ MIN-Cl		70
実施例 2			60
実施例 3	OH(CH ₂) ₃ MIN-Br		87
実施例 4			82
実施例 5	PMIM-Cl		80
実施例 6			70
実施例 7	PMIM-Br		90
実施例 8			82

【0040】

[実施例 9, 10]

合成例 1 で作製したイオン性液体 HO(CH₂)₃MIN-Cl 2.5 g を 110℃で 24 時間加熱真空乾燥した。このイオン性液体 2.5 g と、DNA 1 mg (実施例 9)、1.5 mg (実施例 10) とを混合し、それぞれ 84℃で加熱溶解し、さらに常温で 48 時間放置した。

得られた各 DNA 含有溶液を、光路長 1 mm 角型石英セルに入れ、室温で可視紫外吸収スペクトルを測定した (UV-2500PC、(株) 島津製作所製)。得られたスペクトルを図 1 に示す。

【0041】

図 1 に示されるように、得られた可視紫外吸収スペクトルは、核酸塩基に由来する 260 nm 付近の吸収が DNA の添加量に応じて変化し、また吸収を持たない 320 nm 以上の波長域での吸光度がゼロであったことから、イオン性液体中に DNA が常温においても溶存していることがわかる。

【0042】

[実施例 11, 12]

合成例 1 で作製したイオン性液体 HO(CH₂)₃MIN-Cl 2.5 g を 110℃で 24 時間加熱真空乾燥した。このイオン性液体 2.5 g と、RNA 1 mg (実施例 11)、1.5 mg (実施例 12) とを混合し、それぞれ 74℃で加熱溶解し、さらに常温で 48 時間放置した。得られた各 RNA 含有溶液について、実施例 9 と同様にして可視紫外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルを図 2 に示す。

図 2 に示されるように、得られた可視紫外吸収スペクトルは、核酸塩基に由来する 260 nm 付近の吸収が RNA の添加量に応じて変化し、また吸収を持たない 320 nm 以上

の波長域での吸光度がゼロであったことから、イオン性液体中にRNAが常温においても溶存していることがわかる。

【0043】

[実施例13]

実施例1で調製したDNA含有溶液を120時間保存した後、これに2-プロパノール（東京化成工業（株）製）3mlを混合した。この混合溶液を室温下、遠心分離器（KA-1000、（株）久保田製作所製）により3000rpmで15分間遠心分離を行った後、上澄み溶液を除去した。沈殿物にエタノール3mlを加え、さらに3000rpmで15分間遠心分離を行った後、上澄み溶液を除去した。

沈殿物を0.2mlの蒸留水に溶解し、塩化ナトリウム（和光純薬工業（株）製）10mgを添加した後、エタノール2mlを添加した。得られた溶液を、3000rpmで15分間遠心分離を行い、上澄み溶液を除去した。沈殿物に、85質量%エタノール水溶液2mlを混合し、3000rpmで15分間の遠心分離を行った。上澄み溶液を除去し、沈殿物に、再び85質量%エタノール水溶液2mlを混合して3000rpmで15分間の遠心分離を行った後、上澄み溶液を除去し、最終的に得られた沈殿物を常温で真空乾燥した。

【0044】

乾燥して得られた白色粉末状のDNA 2mgを蒸留水5mlに溶解し、実施例9と同様にして可視紫外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルを図3に示す。

図3に示されるように、核酸塩基に由来する260nmの吸収があり、対照DNAと同様の吸収スペクトルを得たことから、保存後に単離した白色粉末はDNAであることが確認された。

【0045】

さらに白色粉末状のDNA 2mgを蒸留水5mlに溶解した溶液を光路長1mmの角形石英セルにし、室温下、CDスペクトルを測定した（J-720、日本分光（株）製）。得られたスペクトルを図4に示す。

図4に示されるように、対照DNAと同様のスペクトルが得られていることから、保存後に単離した白色粉末は、天然DNAと同様に右巻き2重らせん構造を保持していることが確認された。

【0046】

[実施例14]

実施例2で得られたRNA含有溶液を用いた以外は、実施例13と同様にして白色粉末状のRNAを単離した。

この白色粉末RNAについて、実施例13と同様にして可視紫外吸収スペクトルおよびCDスペクトルを測定した。得られたスペクトルをそれぞれ図5、6に示す。

図5に示されるように、核酸塩基に由来する260nmの吸収があり、対照RNAと同様の吸収スペクトルを得たことから、保存後に単離した白色粉末はRNAであることが確認された。図6に示されるように、対照RNAと同様のスペクトルが得られていることから、保存後に単離した白色粉末は、天然RNAと同様に右巻き2重らせん構造を保持していることが確認された。

【0047】

[実施例15]

合成例7で作製したイオン性液体EMI_m-C₂COO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA（大和化成（株）製）5mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA 5mgがイオン性液体EMI_m-C₂COO 1gに完全に溶解する温度は70℃であった。

【0048】

[実施例16]

合成例7で作製したイオン性液体EMI_m-C₂COO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA（東京化成工業（株）製）5mgと混合し、密封し

た後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA 5mgがイオン性液体EMI_m-C₂COO 1gに完全に溶解する温度は60℃であった。

【0049】

[実施例17]

合成例8で作製したイオン性液体EMI_m-HCOO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でDNA 5mgと混合し、密封した後、加熱しながらDNAの溶解温度を記録した。その結果、DNA 5mgがイオン性液体EMI_m-HCOO 1gに完全に溶解する温度は60℃であった。

【0050】


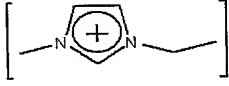
[実施例18]

合成例8で作製したイオン性液体EMI_m-HCOO 1gを、90℃で36時間加熱真空乾燥し、窒素雰囲気下でRNA 5mgと混合し、密封した後、加熱しながらRNAの溶解温度を記録した。その結果、RNA 5mgがイオン性液体EMI_m-HCOO 1gに完全に溶解する温度は48℃であった。

上記実施例15～18において使用したイオン性液体の構造、DNAおよびRNAの各イオン性液体に対する溶解温度を表2に示す。

【0051】

【表2】

	イオン性液体		核酸溶解温度 (℃)
	名称	構造式	
実施例15	EMI _m -C ₂ COO		70
実施例16			60
実施例17	EMI _m -HCOO		60
実施例18			48

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】 実施例9, 10の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図2】 実施例11, 12の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図3】 実施例13の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図4】 実施例13のCDスペクトルを示す図である。

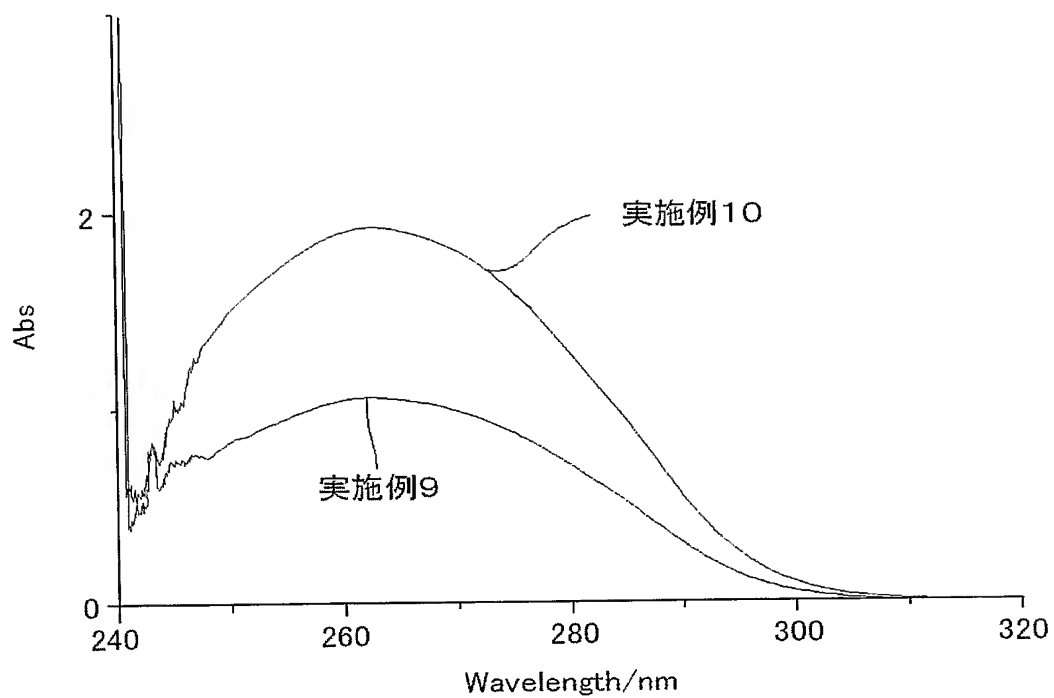
【図5】 実施例14の可視紫外吸収スペクトルを示す図である。

【図6】 実施例14のCDスペクトルを示す図である。

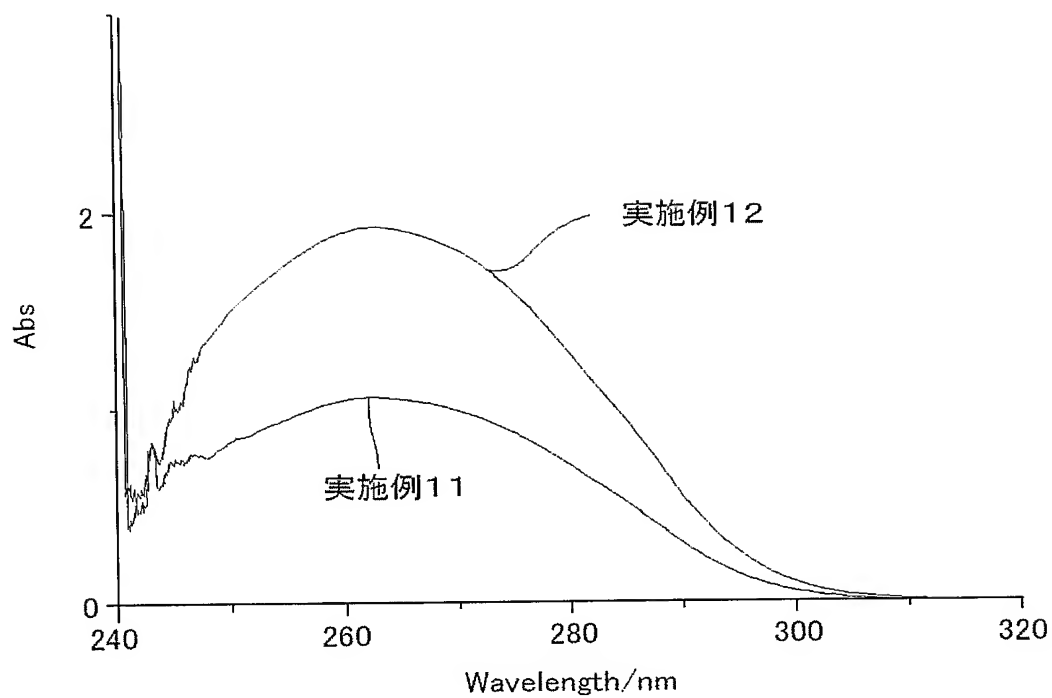
【図7】 合成例8で得られたイオン性液体EMI_m-HCOOのNMRチャートを示す図である。

【書類名】 図面

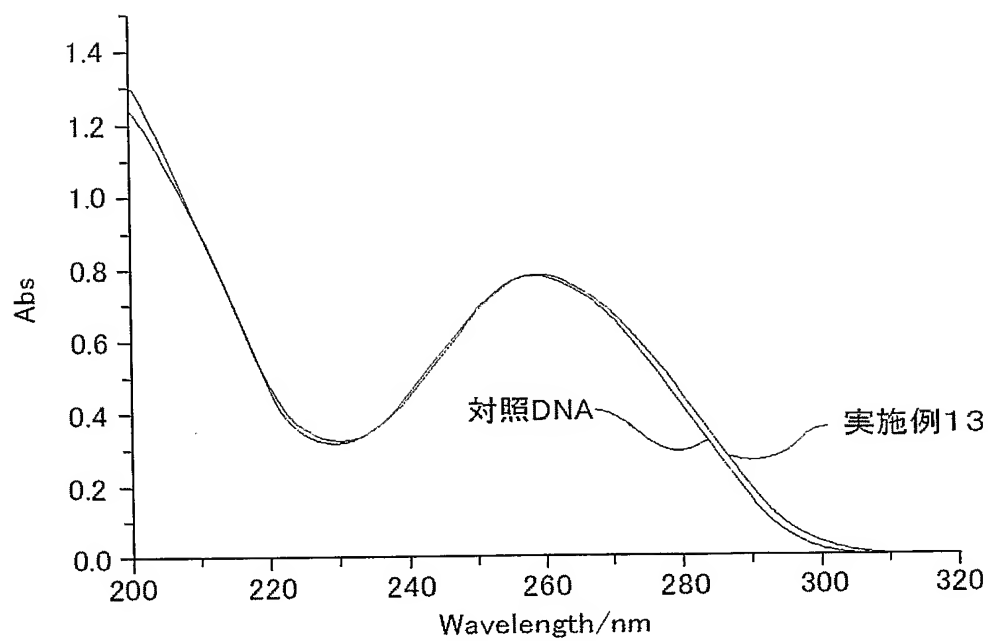
【図 1】



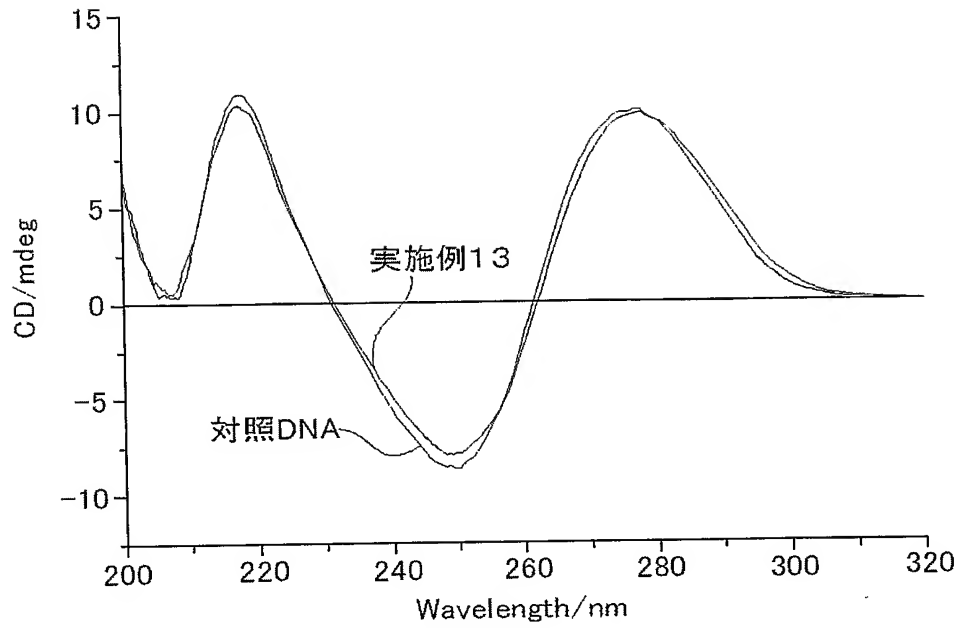
【図 2】



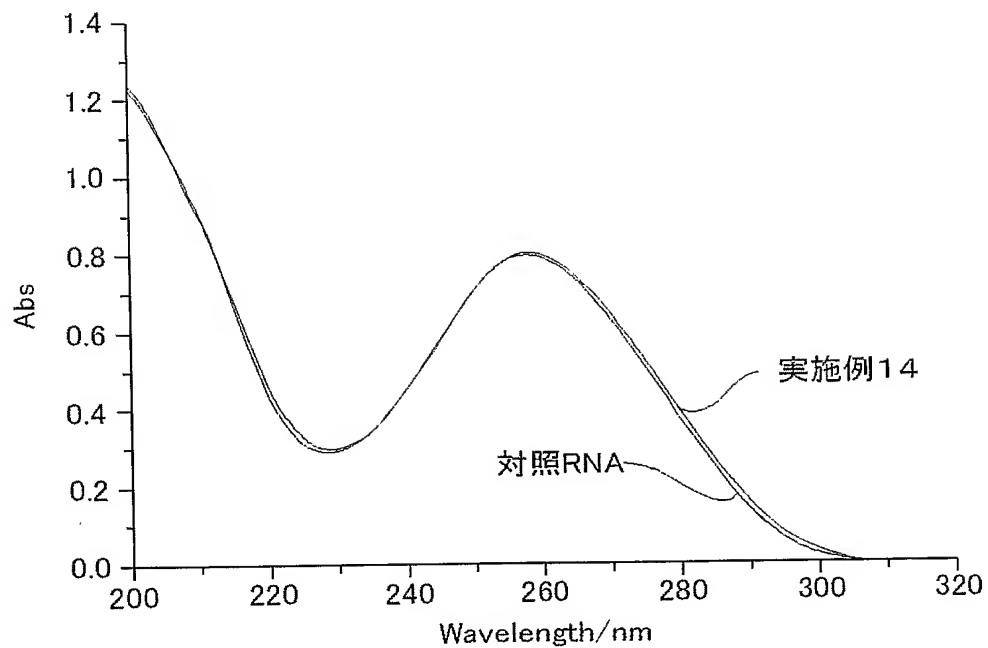
【図 3】



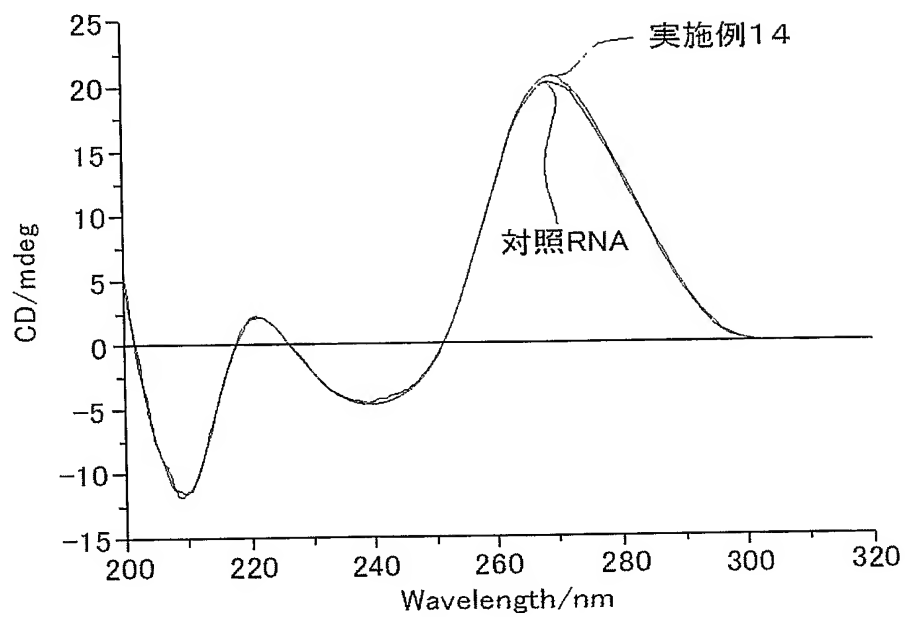
【図 4】



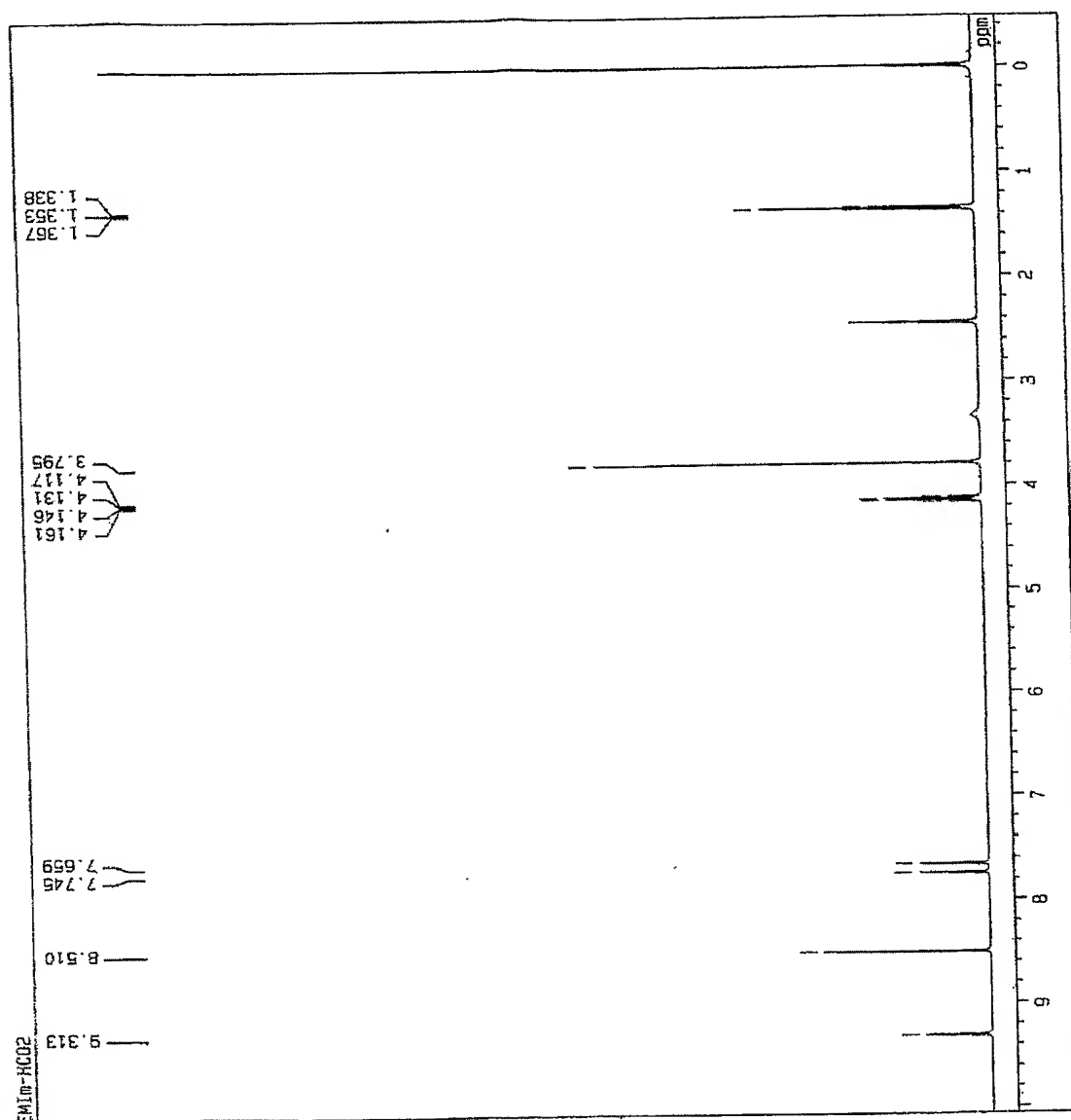
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAおよびRNA等の核酸を容易に溶解できるとともに、それらの長期保存が可能な核酸溶解用溶媒、およびこの溶媒を用いた核酸含有溶液、核酸保存方法を提供すること。

【解決手段】 DNA, RNA等の核酸を溶解させる核酸溶解用溶媒として、例えば、アンモニウムカチオン、イミダゾリウムカチオン、ピリジニウムカチオン等を有するイオン性液体からなるものを用い、この溶媒に核酸を溶解させて保存する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 2 1 7 5 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 2 3 2 2 9 4 7]

1. 変更年月日

2 0 0 2 年 9 月 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都江戸川区一之江町 3 0 0 2 番地 ライオンズガーデン一

之江 3 1 4

氏 名

大野 弘幸

特願 2 0 0 4 - 2 1 7 5 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 3 7 4]

1. 変更年月日

1 9 9 3 年 3 月 3 0 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 3 1 番 1 1 号

氏 名

日清紡績株式会社